

Федеральное государственное автономное учреждение высшего
профессионального образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

на правах рукописи

Усачев Константин Сергеевич

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ АМИЛОИДОГЕННЫХ А β
ПЕПТИДОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С МОДЕЛЬНЫМИ
МЕМБРАНАМИ В РАСТВОРАХ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ
ЯМР**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре общей физики и в лаборатории ЯМР Института физики Казанского (Приволжского) Федерального Университета

Научный руководитель: **Клочков Владимир Васильевич**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Скоринкин Андрей Иванович**
доктор физико-математических наук,
доцент кафедры радиоэлектроники
Института физики К(П)ФУ, г. Казань

Зуев Юрий Федорович
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией биофизической
химии наносистем Казанского института
биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г.
Казань

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова, г. Москва

Защита состоится «26» декабря 2013 года в 16:30 на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского (Приволжского) федерального университета <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__» ноября 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор



М.В. Еремин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Одним из наиболее эффективных методов изучения структуры биологических макромолекул в растворе является спектроскопия ЯМР высокого разрешения. Традиционно исследования пространственного строения органических соединений в растворах основаны на использовании современных подходов в ЯМР, таких как двумерная ЯМР NOESY спектроскопия (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера), которая позволяет определять межпротонные расстояния между магнитными ядрами, отстоящими друг от друга на расстоянии до 5 Å; а так же гетероядерная корреляционная спектроскопия (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и др.), позволяющая регистрировать такие ЯМР параметры как константы остаточного диполь-дипольного взаимодействия (в английском варианте RDC - Residual Dipolar Coupling) $^1D_{\text{CH}}$, которые в свою очередь несут информацию об углах между вектором внешнего магнитного поля и направлением C-H связей. Современные расчетные методы позволяют на основе полученных данных из экспериментов ЯМР определять конформации и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) исследуемых соединений.

Болезнь Альцгеймера (БА; также сенильная деменция альцгеймеровского типа) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях головного мозга. Бляшки состоят из фибрилл, образованных в результате агрегации малых пептидов длиной в 39-43 аминокислотных остатков, именуемых амилоидными A β -пептидами. Эти пептиды являются продуктом энзиматического расщепления более крупного белка-предшественника бета-амилоида (ПБА).

Нейротоксичное действие A β пептидов проявляется в результате их взаимодействия с клеточной мембраной. Предполагается, что A β пептиды, непосредственно нарушают работу мембран нейронов вызывая образование пор, что приводит к изменениям ионного гомеостаза. Отсюда описание пространственного строения комплекса «A β пептид–мембрана», также как и строение A β пептидов в растворе, позволит подойти к пониманию механизмов протекающих на поверхности клеток, что может дать возможность поиска лекарственных препаратов, ингибирующих образование сенильных бляшек.

Цель и задачи исследования.

Целью диссертационной работы являлось определение пространственной структуры A β пептидов с нативным содержанием изотопов и их комплексов с модельными биологическими мембранами в растворе методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения, включая двумерные.

Объекты исследования.

В рамках данной работы в качестве объектов исследования были выбраны следующие Аβ пептиды (аминокислотные последовательности в общепринятых буквенных кодах, соответствующих номенклатуре IUPAC/IUBMB (International Union of Pure and Applied Chemistry; International Union of Biochemistry and Molecular Biology) приведены на рисунке 1): Аβ₁₋₄₀; arc-Аβ₁₋₄₀(E22G), для которого известно, что точечная мутация в позиции E22 ускоряет процессы олигомеризации Аβ пептидов и образования фибрилл и приводит к развитию БА в более раннем возрасте (52-57 лет). А также активные фрагменты пептида Аβ₁₋₄₀: Аβ₁₀₋₃₅, который содержит сайты связывания холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкоголь дегидрогеназы (ABAD) (участок с V12 по D23 аминокислотные остатки), а также содержит область аминокислотной последовательности с высокой степенью сродства с энзимами и каталазами (I31–M35); Аβ₁₃₋₂₃, который, как предполагается, является самостоятельным сайтом связывания олигомеров, а также содержит предполагаемый центр агрегации; Аβ₁₆₋₂₂, который, как предполагается, является центром агрегации Аβ пептидов.

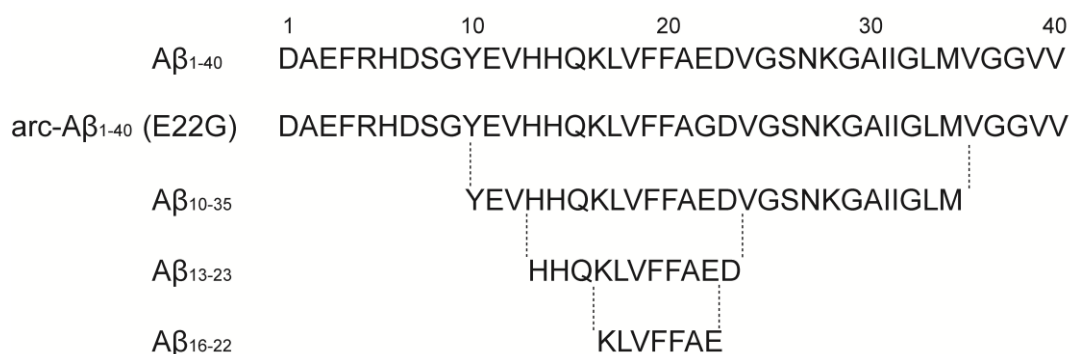


Рисунок 1. Аминокислотные последовательности исследованных пептидов в общепринятых буквенных кодах, соответствующих номенклатуре IUPAC/IUBMB.

В качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны нами использовались мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН, C₁₂H₂₅OSO₃Na).

Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. определение конформации и геометрических параметров (координаты атомов в pdb формате) пептидов в растворе с мицеллами ДСН методом двумерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения;
2. выявление участков аминокислотной последовательности, отвечающих за комплексообразование Аβ пептидов с модельной мембраной;
3. построение модели комплекса «пептид-поверхность модельной мембраны» на основе полученных экспериментальных данных.

Методы исследования и использованная аппаратура.

При решении поставленных задач использовались методы двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов ЯМР в различных растворителях и средах, а также теоретическое моделирование молекулярной структуры. Регистрацию 1D и 2D (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C) спектров ЯМР проводили на ЯМР спектрометре AVANCE II-500 (Bruker) (500 МГц (^1H), 125,76 МГц (^{13}C)) при температуре 293 К. Отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H проводилось с помощью стандартной методики на основе совместного использования 2D ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY спектроскопии; сигналы ядер ^{13}C были отнесены посредством 2D ^1H - ^{13}C HSQC экспериментов. Полученные экспериментальные данные о межпротонных расстояниях использовались в качестве входных данных для расчета пространственной структуры пептидов методом молекулярной динамики в программе Xplor-NIH.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Научная новизна.

1. На основе экспериментальных данных ЯМР спектроскопии высокого разрешения установлено наличие вторичной структуры в виде 3_{10} -спирали для А β пептидов: А β_{16-22} , А β_{13-23} , А β_{10-35} и arg-А β_{1-40} (E22G) в растворе с мицеллами ДСН.
2. Определено положение А β пептидов на поверхности мицеллы ДСН, предложена модель комплекса «пептид-поверхность биологической мембраны».
3. Установлено, что процесс комплексообразования пептида с мицеллой происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19, F20 и G29-M35.
4. Впервые получена пространственная структура пептида arg-А β_{1-40} (E22G) в растворе ДСН. Установлено, что точечная мутация в аминокислотной последовательности в позиции E22 ведет к изменению во вторичной структуре бета-амилоида в области с 13 по 23 аминокислотного остатка, и к тому, что данная область перестает участвовать в процессе комплексообразования пептида с мицеллой ДСН.
5. Полученные данные о пространственном строении А β пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула бета-амилоида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки. Взаимодействие А β пептидов с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, нарушающих работу мембран нейронов.

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается: согласием с другими исследованиями, проводимыми в этом направлении с помощью других подходов в спектроскопии ЯМР (например, подход, основанный на использовании парамагнитных агентов в экспериментах ЯМР); использованием современного ЯМР оборудования и программного обеспечения; методик, адекватных задачам исследования.

Научная и практическая значимость работы.

Установленные спектральные параметры ЯМР и измеренные межпротонные расстояния в изученных соединениях могут быть использованы в качестве справочного материала. Координаты атомов (в pdb формате), входящих в состав изученных пептидов, определенные путем анализа экспериментальных значений межпротонных расстояний могут быть использованы при сравнении с координатами атомов аналогичных аминокислотных последовательностей (в частном случае фрагментов цепей полипептидов).

Полученные данные о пространственном строении Аβ пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула Аβ пептида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки.

Личный вклад автора.

Участие при постановке целей и задач исследования. Регистрация одно- и двумерных спектров ЯМР, написание статей по теме проведенных исследований. Автору принадлежат результаты интерпретации спектров ЯМР (информация о геометрии исследованных соединений) и результаты компьютерного моделирования молекулярных структур.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих российских и международных семинарах и конференциях: Итоговые конференции Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань, 2010, 2012); V Всероссийская конференция “Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях” (г. Казань, 2011); III Региональная научно-практическая конференция с международным участием «Синтез и перспективы использования новых биологически активных соединений» (г. Казань, 2011); II международный симпозиум КФУ – РИКЕН, посвященный междисциплинарным исследованиям (г. Казань, 2012); конкурс на соискание именных стипендий мэра г. Казани (г. Казань, 2012).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории ЯМР Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета. Работа на отдельных этапах поддерживалась грантами РФФИ (09-03-00077а), Министерства образования и науки РТ (12-03-97040), Министерства

образования и науки РФ (К(П)ФУ, 2.2792.2011), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (02.740.11.0702).

Изученные в работе соединения синтезированы в лаборатории пептидного синтеза отделения химии поверхностных явлений технического университета Лулео под руководством доктора физико-математических наук Филиппова А.В. (Luleå University of Technology, Luleå, SE-91187, Sweden).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 работы в реферируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 161 (включая 28 страниц приложения) страницах машинописного текста и содержит 64 рисунка, 20 таблиц; включает введение, три главы, основные результаты и выводы, список литературы из 131 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором изложены основные положения теории спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Рассмотрено теоретическое обоснование гомоядерных (COSY, TOCSY) и гетероядерных (HMQC, HSQC) корреляционных экспериментов ЯМР. Рассмотрены особенности спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) и NOESY спектроскопии, а также спектроскопии ЯМР ориентированных молекул в лиотропных жидкостях.

Во второй главе описаны объекты и методы исследования. Приведено описание процесса приготовления образцов для ЯМР исследований, а так же описаны параметры экспериментов ЯМР и расчетов пространственной структуры исследуемых молекул.

Третья глава посвящена результатам и обсуждению исследования пространственной структуры Аβ пептидов и их комплексов с мицеллами ДСН в растворах методом ЯМР. Приведен литературный обзор, касающийся строения белков. Обсуждаются некоторые Аβ пептиды, участвующие в механизме развития болезни Альцгеймера, а также мицеллы на основе додецилсульфата натрия, использующиеся в качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны. Используя подход, основанный на анализе экспериментально полученных межпротонных расстояний с помощью метода молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH, определены конформации и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) Аβ пептидов Аβ₁₆₋₂₂, Аβ₁₃₋₂₃, Аβ₁₀₋₃₅, Аβ₁₋₄₀, arc-Аβ₁₋₄₀ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН. На основе рассчитанных структур Аβ пептидов

растворе с мицеллами ДСН были определены участки аминокислотной последовательности, отвечающих за комплексообразование А β пептидов с модельной мембраной, а также построены модели комплексов: пептид – модель поверхности биологической мембраны (мицеллы на основе ДСН).

Структура пептида А β ₁₆₋₂₂ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. Для создания лекарственных препаратов препятствующих развитию сенильной деменции необходимо иметь точную информацию о механизме агрегации А β пептидов. Предполагается, что ядром агрегации является активный участок пептида А β ₁₋₄₀ между 16 и 22 аминокислотными остатками [1]. По этой причине пространственное строение фрагмента А β ₁₆₋₂₂ (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu) представляет самостоятельный интерес.

Гептапептид А β ₁₆₋₂₂ был растворен в 20 мМ растворе фосфатного буфера при pH = 7,3, 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H использовался подход, основанный на совместном использовании 2D ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY методик ЯМР. К сожалению, в силу того, что молекулы гептапептида А β ₁₆₋₂₂ попадают под условие быстрого движения, в спектрах 2D ^1H - ^1H NOESY экспериментов ЯМР в растворе наблюдалось небольшое количество кросс-пиков, и практически все они были между протонами внутри аминокислотных остатков. Для установления структуры, помимо межпротонных расстояний использовались значения констант спин-спинового взаимодействия (между амидными протонами и протонами альфа групп аминокислотных остатков), определенные из 2D ^1H - ^1H TOCSY спектра. Значение полученных констант скалярного спин-спинового взаимодействия, в свою очередь, накладывают ограничения на величины двугранных углов исследуемой молекулы. Также для определения структуры исследуемого пептида был использован метод, основанный на анализе величин констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия. Исследуемый гептапептид растворялся в ориентированной жидкокристаллической среде представляющей собой смесь n-алкил-поли(этилен)гликоля (C₁₂E₅, где 12 – число атомов углерода в n-алкильной группе и 5 – число единиц гликоля в поли-этилен гликоле) (чистота $\geq 98\%$, Sigma), нормального спирта (гексанол) и исходного буферного раствора.

Диполь-дипольное взаимодействие (ДДВ) между магнитными ядрами внутри молекулы помещенной в растворе полностью усредняется вследствие хаотичного движения молекул. Если же растворить молекулу в лиотропной жидкокристаллической среде, то поступательное и вращательное движение молекул перестанет быть изотропным, так как будет присутствовать взаимодействия с магнитно-ориентированными молекулярными образованиями. Эта проявляется в ЯМР спектрах, в виде констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия (Рис.2).

Из двумерных ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE спектров ЯМР (Рис.2) были определены величины констант остаточного ДДВ, которые в свою очередь, зависят от угла между направлениями магнитного поля и C-H связи.

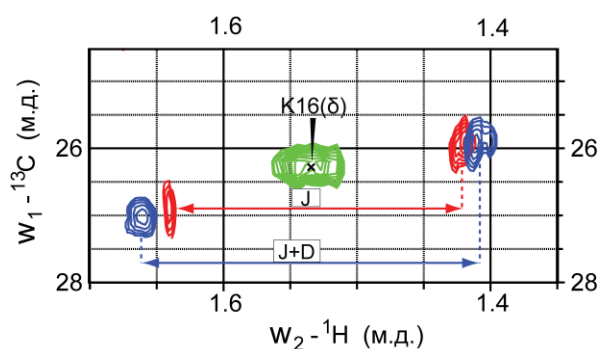


Рисунок 2. Суперпозиция областей ^1H - ^{13}C 2D спектров ЯМР гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$: ^1H - ^{13}C HSQC спектр $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе 20 мМ фосфатного буфера при $\text{pH} = 7.3$ (центральный кросс-пик); ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE спектр ЯМР $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе 20 мМ фосфатного буфера при $\text{pH} = 7.3$ (2 внутренних пика); ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE спектр ЯМР $\text{A}\beta_{16-22}$ в смеси n -алкил-поли(этилен)гликоля (C_{12}E_5), нормального спирта (гексанол) и исходного фосфатного буфера (2 внешних пика).

Таблица 1. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$\text{A}\beta_{16-22}$
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	72
Внутриостаточные	29
Последовательные ($ i-j =1$)	26
Среднего диапазона ($1 < i-j < 4$)	17
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	
КССВ J_{HNCH}	
константы остаточного ДДВ $^1D_{\text{CH}}$	
Попарное среднееквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
3_{10} -спиральный регион 16-22	$0,10 \pm 0,05$

Небольшое число экспериментально полученных межпротонных расстояний, констант спин-спинового взаимодействия между амидными протонами и протонами альфа групп, а так же констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, к сожалению, не позволяют рассчитать точную 3D структуру пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера ($\text{pH}=7,3$) структура гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ соответствует случайному клубку.

Для исследования комплексов олигопептид-поверхность мембраны доступно два варианта синтетической модели поверхности мембраны клетки: мицеллы на основе ПАВ, и небольшие фосфолипидные везикулы. Среда, которая наиболее близко соответствует нативному бислою липида, состоит из фосфолипидных везикул, минимальный размер частиц которых составляет 250 - 300 Å в диаметре.

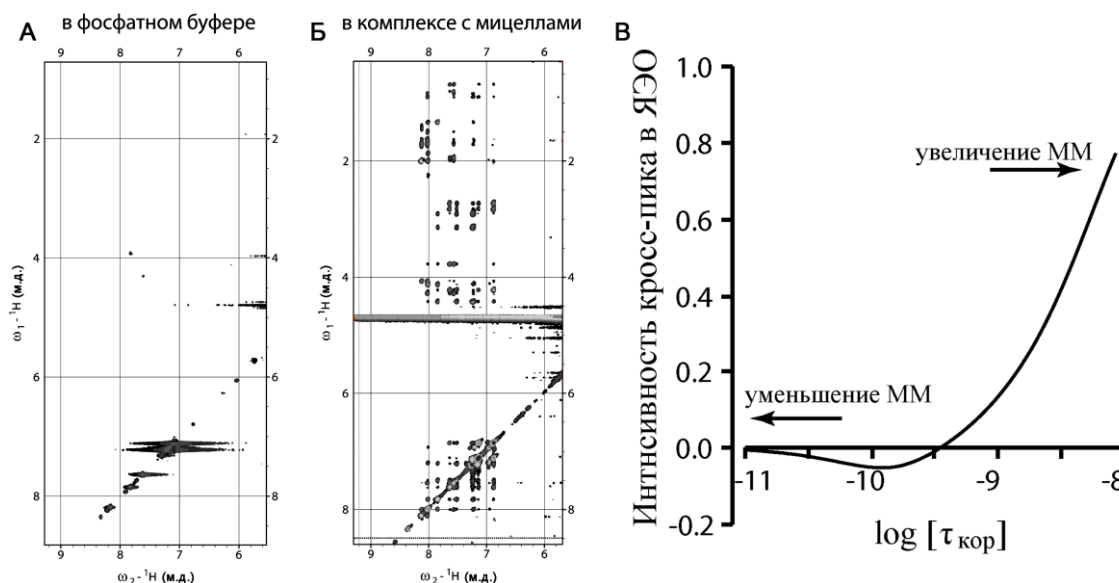


Рисунок 3. Область двумерного ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектра гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$: А) в растворе 20 мМ фосфатного буфера, $\text{pH} = 7.3$, Б) в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. В) Зависимость ЯЭО от времени корреляции. Для пептида длиной в 20 аминокислотных остатков на спектрометре с частотой 500 МГц время корреляции ~ 1 нсек ($\log \tau_{\text{кор}} = -9$).

Частицы такого размера имеют большое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 4 \times 10^{-6}$ с). Длинные времена корреляции приводят к коротким значениям времен поперечной релаксации T_2 , что в свою очередь приводит к уширению резонансных сигналов в спектрах ЯМР и к увеличению спиновой диффузии в ^1H NOE экспериментах. Короткие времена поперечной релаксации T_2 , приводят к уменьшению информативности 2D ЯМР экспериментов (TOCSY, HSQC, HMBSC, NOESY), необходимых как для отнесения резонансных сигналов, так и для определения пространственной структуры белков в комплексе. Кроме фосфолипидов, формирующих бислои или мультибислои в водных средах, существуют и другие органические соединения, формирующие мицеллярные системы, в которых мицеллы рассредоточены по всему объему, находящиеся в быстром обмене с мономерными структурами. ККМ ПАВ является концентрацией ПАВ в растворе, при которой в системе образуются в заметных количествах устойчивые мицеллы. Полярная группа мицелл ПАВ веществ в водной среде расположена на оболочке мицеллы, которая является гидрофильной, а центральная часть мицеллы является гидрофобной. В водном растворе мицеллы ведут себя как глобулярные белки, содержащие от 60 мономерных молекул, при этом частицы такого размера имеют относительно небольшое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 5 \times 10^{-8}$ с). Интересным, с точки зрения ЯМР спектроскопии, является то, что при связывании олигопептида с мицеллами образуется комплекс олигопептид-мицелла, молекулярная масса которого становится больше, чем у несвязанного олигопептида, что может перевести олигопептид из разряда малых молекул, подпадающих под условие быстрого обмена, в разряд молекул, подпадающих под условие медленного обмена.

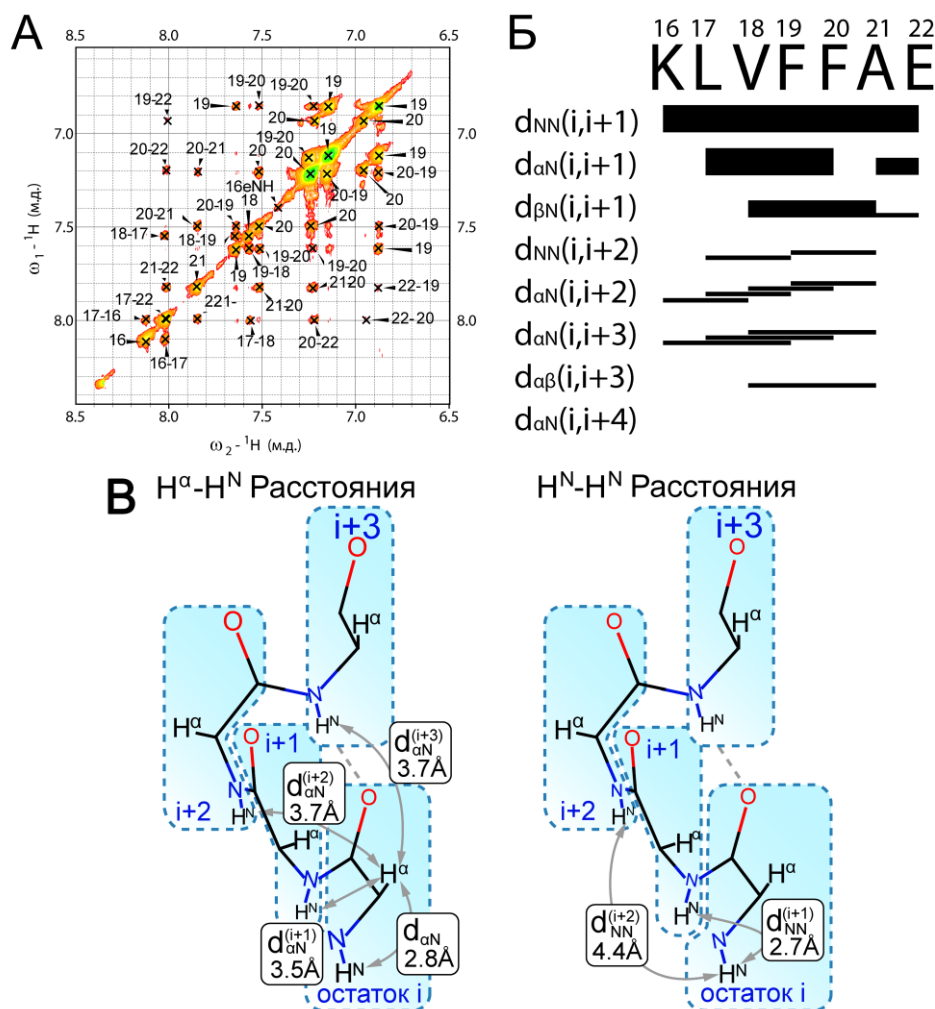


Рисунок 4. А) Область двумерного ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектра гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. Б) Межпротонные контакты ЯЭО для $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе с мицеллами ДСН. Толщина линий соответствует интенсивности ЯЭО контактов. В) Характерные межатомные расстояния конформации пептида в виде 3_{10} -спирали.

Последнее обстоятельство позволяет использовать спектроскопию ЯМР NOESY при решении структурных задач и для небольших по количеству аминокислотных остатков белков и олигопептидов (Рис.3).

В спектрах ^1H - ^1H NOESY (Рис.3,4) гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе с мицеллами ДСН наблюдалось значительное увеличение кросс-пиков, к тому же если в буферном растворе сигналы были с разными фазами, то в растворе с мицеллами все сигналы стали с положительной фазой. Данные факты являются свидетельством увеличения размера исследуемого вещества и подтверждением того, что образовался комплекс пептид-мицелла.

Отметим, что практически для всех аминокислотных остатков наблюдались кросс-пики между протонами альфа групп i -го аминокислотного остатка и NH протонами $i+2$ -го и $i+3$ -го (Рис.4). Также величины некоторых расстояний являются характерными для вторичной структуры называемой 3_{10} спиралью.

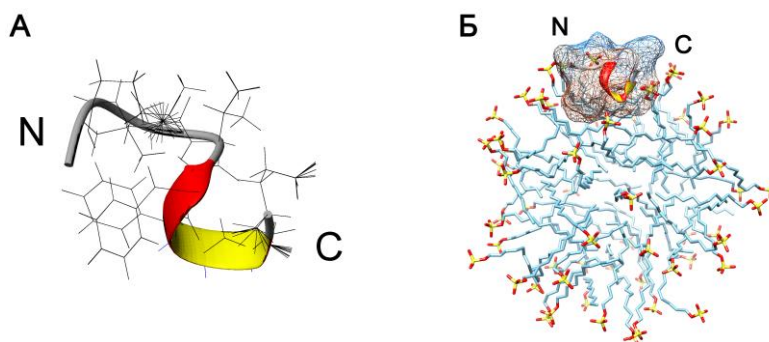


Рисунок 5. А) Структура гептапептида $A\beta_{16-22}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса «гептапептид $A\beta_{16-22}$ – мицелла на основе ДСН».

Экспериментально полученные межпротонные расстояния использовались как входные данные для расчетов структуры методом молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH. Полученная структура пептида в растворе с мицеллами ДСН приведена на рисунке 5А. В спектрах гептапептида в водном растворе и в растворе с мицеллами ДСН, наблюдалось, что химические сдвиги протонов α - и β - групп F19, F20 и β -группы L17 сместились в область сильных полей, а химические сдвиги K16, V18 и E22 сместились в слабые поля. Это связано с тем, что вследствие взаимодействия аминокислотных остатков пептида с электроотрицательно заряженной поверхностью мицеллы произошло изменение конформации пептида. На основе этих данных была построена модель исследуемого комплекса (Рис.5Б). Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным установлено, что взаимодействие гептапептида $A\beta_{16-22}$ с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20.

Структура пептида $A\beta_{13-23}$ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. Конформация пептида в виде 3_{10} спирали является менее энергетически выгодной чем, например, в виде α -спирали, по этой причине, для более детального изучения центрального фрагмента пептида $A\beta_{1-40}$, был синтезирован участок с 13 по 23 аминокислотный остаток ($A\beta_{13-23}$). К сожалению, так же как и для гептапептида $A\beta_{16-22}$ для $A\beta_{13-23}$, небольшого числа экспериментально полученных межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, было не достаточно для расчета 3D структуры пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера (pH=7,3) структура пептида $A\beta_{13-23}$ так же соответствует случайному клубку. Далее бета-пептид $A\beta_{13-23}$ исследовался в растворе ДСН.

Наличие множества ЯЭО контактов среднего диапазона $dNN_{(i,i+1)}$, $d\alpha N_{(i,i+3)}$, and $d\alpha N_{(i,i+2)}$ указывает на то, что присутствует упорядоченная структура пептида, предположительно в виде 3_{10} спирали (Рис. 6). На основе большого количества ЯЭО контактов среднего диапазона была рассчитана 3D структура $A\beta_{13-23}$ в растворе с мицеллами ДСН методом молекулярной динамики (Рис.7А).

Таблица 2. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$A\beta_{13-23}$
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	72
Внутриостаточные	39
Последовательные ($ i-j =1$)	19
Среднего диапазона ($1 < i-j < 4$)	14
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
3_{10} -спиральный регион 13-23	$0,13 \pm 0,05$

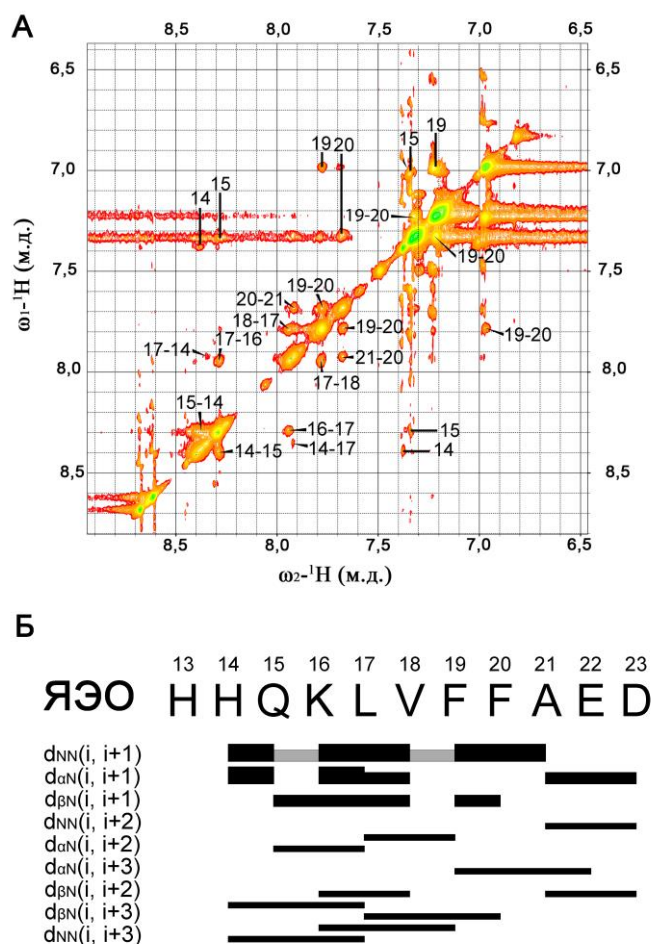


Рисунок 6. А) Область двумерного ЯМР $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY спектра $A\beta_{13-23}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. Б) Межпротонные контакты ЯЭО для $A\beta_{13-23}$ в растворе с мицеллами ДСН. Толщина линий соответствует интенсивности ЯЭО контактов. Серым цветом указаны ЯЭО контакты, когда однозначное отнесение сигналов в спектрах NOESY было невозможно из-за перекрывания сигналов.

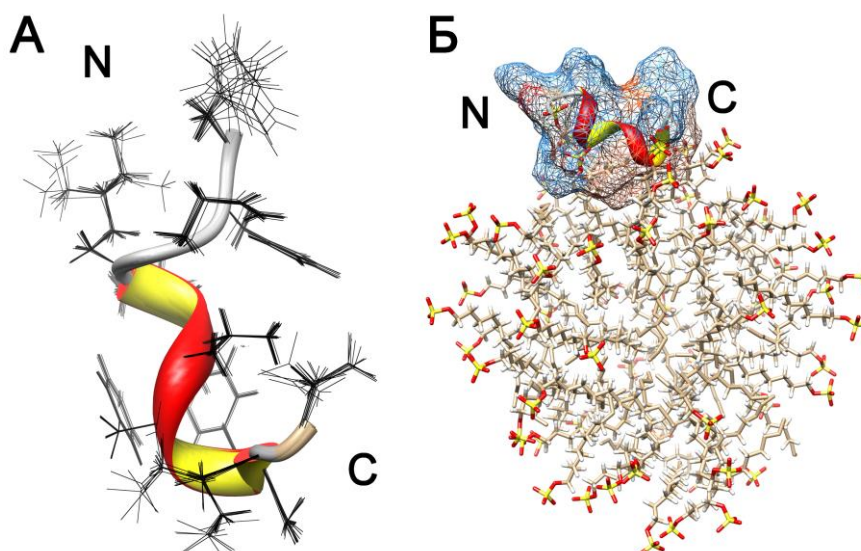


Рисунок 7. А) Структура пептида $A\beta_{13-23}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса «пептид $A\beta_{13-23}$ – мицелла на основе ДСН».

Сопоставляя структуру пептида $A\beta_{13-23}$ в растворе с мицеллами ДСН с полученными ранее структурами для гептапептида $A\beta_{16-22}$ в том же растворе, можно установить хорошее соответствие данных структур в указанной области. Более того, так же как и у гептапептида $A\beta_{16-22}$ у данного пептида наблюдалось наличие гидрофобной области между 17 и 20 аминокислотными остатками. На основе полученных данных была построена структура комплекса «пептид-мицелла» для $A\beta_{13-23}$ (Рис.7Б). Причем, определено, что аминокислотные остатки L17, F19 и F20 ориентированы к поверхности мицеллы, в то время как остальные остатки аминного и карбоксильного концов ориентированы в противоположную сторону.

В работе [2] было установлено, что аминокислотный остаток A21 играет важную роль в стабилизации структуры альфа-спирали для пептида $A\beta_{11-28}$, а так же для его «арктической» и «итальянской» мутации. Результаты расчетов методом молекулярной динамики структуры комплекса «пептид-мицелла» в указанной работе показали что, $A\beta_{11-28}$ скорее всего расположен на поверхности мицеллы, что коррелирует с нашими экспериментальными данными и результатами. Согласно полученным нами экспериментальным данным было установлено, что взаимодействие $A\beta_{13-23}$ с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20. Известно, что область $A\beta$ пептида с V12 по D23 аминокислотные остатки является сайтом связывания для холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкоголь дегидрогеназы (ABAD). Таким образом, взаимодействие пептида $A\beta_{13-23}$ с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, которые нарушают работу мембран нейронов [3].

Структура пептида $A\beta_{10-35}$ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. Для более детального изучения механизма взаимодействия $A\beta$ пептида с поверхностью мицеллы ДСН, был синтезирован более крупный пептид $A\beta_{10-35}$, состоящий из 26 аминокислотных остатков, для которого наблюдалось лучшая растворимость в водном растворе, чем для полноразмерного $A\beta_{1-40}$. Так же как и для пептидов $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$ для данного пептида наблюдалось небольшое число экспериментально полученных межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, что так же было не достаточно для расчета 3D структуры пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера (pH=7,3) структура пептида $A\beta_{10-35}$ так же соответствует случайному клубку.

Пептид $A\beta_{10-35}$ был растворен в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7,3, 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовался подход, основанный на совместном использовании 2D 1H - 1H TOCSY и 1H - 1H NOESY методик ЯМР. С помощью 2D 1H - 1H NOESY спектров ЯМР с вариацией времени смешивания τ_m (75, 100, 120, 200 мс) были определены межпротонные расстояния для аминокислотных остатков пептида $A\beta_{10-35}$.

К сожалению, для однозначного расчета пространственной структуры пептида $A\beta_{10-35}$ из 26-ти аминокислотных остатков полученных 15 расстояний было недостаточно. Поэтому для повышения качества расчетов структуры исследуемого пептида было решено использовать методику, основанную на анализе констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия. Однако, так же как и в случае с $A\beta_{16-22}$ и $A\beta_{13-23}$ для $A\beta_{10-35}$, небольшого числа экспериментально полученных межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия, было не достаточно для расчета 3D структуры пептида в растворе, однако характерные расстояния и значения констант свидетельствуют о том, что в растворе фосфатного буфера (pH=7,3) структура пептида $A\beta_{10-35}$ так же соответствует случайному клубку.

Таблица 3. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$A\beta_{10-35}$
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	151
Внутриостаточные	81
Последовательные ($ i-j =1$)	44
Среднего диапазона ($1< i-j <4$)	26
Дальнего диапазона ($ i-j >4$)	
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
3_{10} -спиральный регион 13-19	$0,70 \pm 0,24$

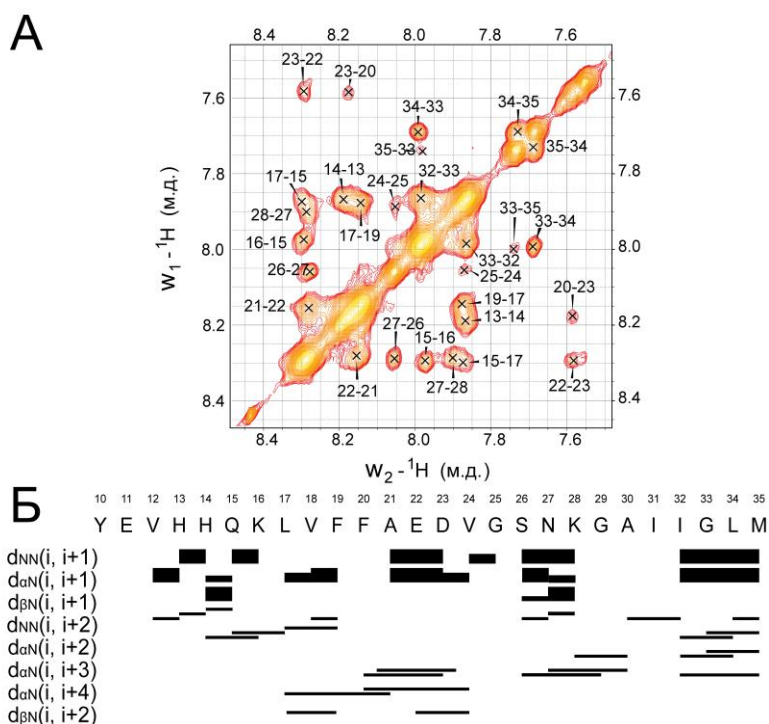


Рисунок 8. А) Область двумерного ЯМР ^1H - ^1H NOESY спектра $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К. Б) Межпротонные контакты ЯЭО для $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе с мицеллами ДСН. Часть ЯЭО контактов не приведена вследствие перекрывания и уширения сигналов.

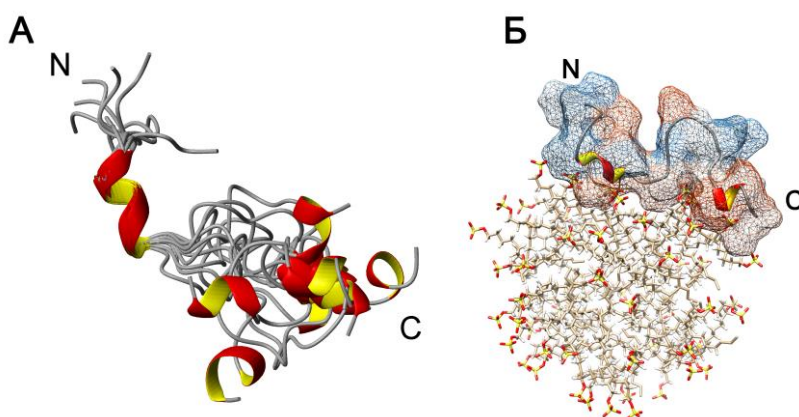


Рисунок 9. А) Структура пептида $\text{A}\beta_{10-35}$ в водном растворе (90% $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса пептида $\text{A}\beta_{10-35}$ – мицелла на основе ДСН.

Как говорилось ранее, особое значение для биохимических исследований представляет структура $\text{A}\beta$ пептидов в комплексе с модельными биологическими мембранами. По аналогичной методике, как это было показано для $\text{A}\beta_{13-23}$ и $\text{A}\beta_{16-22}$, $\text{A}\beta_{10-35}$ был растворен в растворе с мицеллами ДСН. В отличие от NOESY спектров ЯМР $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе, в растворе с мицеллами ДСН наблюдалось большое количество ЯЭО контактов, как между протонами внутри аминокислотных остатков, так и между различными аминокислотными остатками (Рис.8). Большое количество ЯЭО контактов среднего диапазона позволяет рассчитать методом молекулярной динамики 3D структуру пептида $\text{A}\beta_{10-35}$ в растворе с мицеллами ДСН. (Рис.9А). Для данного пептида в растворе с

мицеллами ДСН наблюдалось наличие двух областей со спиральной конформацией на участках от Н13 до F19 и от G29 до M35. Также на данных участках наблюдались две гидрофобные области. Повторяя все аналогичные процедуры, что и для предыдущих пептидов в растворе с мицеллами ДСН, была определена структура комплекса «пептид $A\beta_{10-35}$ – мицелла ДСН» (Рис.9Б). Таким образом, определено, что пептид $A\beta_{10-35}$ взаимодействует с поверхностью мицеллы двумя областями, в которые входят аминокислотные остатки 13-19 и 29-35. Известно, что область $A\beta$ пептида с V12 по D23 аминокислотные остатки является сайтом связывания для холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкоголь дегидрогеназы (ABAD), а также область аминокислотной последовательности с I31 по M35 обладает высокой степенью сродства к энзимам и каталазам [4]. Таким образом, взаимодействие пептида $A\beta_{10-35}$ с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, которые нарушают работу мембран нейронов.

Структура пептида $A\beta_{1-40}$ в буферном растворе и в растворе с мицеллами ДСН. На основе экспериментально полученных структур $A\beta$ пептидов в растворе с мицеллами ДСН нами было установлено, что $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$ и $A\beta_{10-35}$ образуют комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 13-20 и 29-35), а так же что, взаимодействие пептида с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20. Полученные результаты позволяют подойти к изучению структуры в растворе и в комплексе с модельными мембранами полноразмерного пептида $A\beta_{1-40}$. Пептид $A\beta_{1-40}$ растворялся в 20 мМ фосфатном буфере при pH=7,3, 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовался подход, основанный на совместном использовании 2D 1H - 1H TOCSY и 1H - 1H NOESY методик.

Таблица 4. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	$A\beta_{1-40}$	
	р-р (pH=7,3)	ДСН
Всего ЯЭО контактов	34	57
Внутриостаточные	4	44
Последовательные ($ i-j =1$)	26	7
Среднего диапазона ($1< i-j <4$)	3	5
Дальнего диапазона ($ i-j >4$)	1	1
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур		
3_{10} -спиральный регион 13-23	1,17±0,35	1,15±0,40
3_{10} -спиральный регион 35-40		0,91±0,36

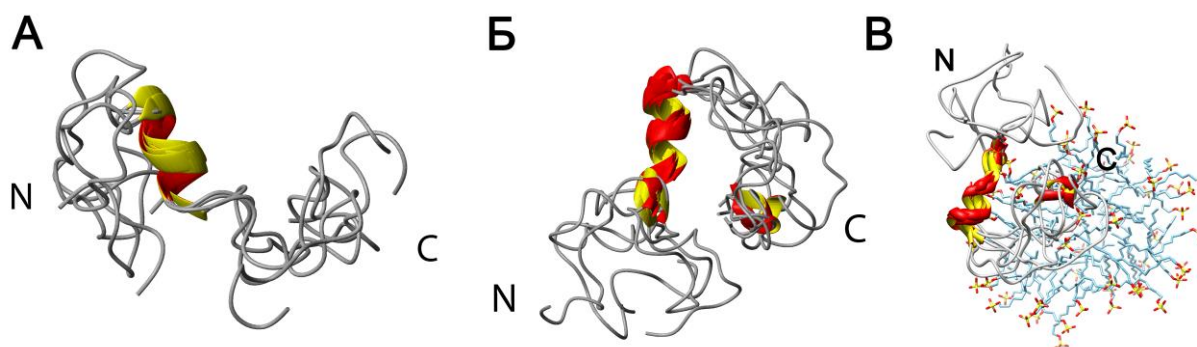


Рисунок 10. А) Структура $A\beta_{1-40}$ в 20 мМ фосфатном буфере при $pH = 7,3$, 293 К. Б) Структура $A\beta_{1-40}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. В) Строение комплекса « $A\beta_{1-40}$ – мицелла на основе ДСН».

Для определения межпротонных расстояний, напрямую характеризующих пространственную геометрию пептида $A\beta_{1-40}$ в растворе, записывались 2D NOESY спектры ЯМР с вариацией времени смешивания τ_m (75, 100, 120, 200 мс). Наблюдались кросс-пики в 2D 1H - 1H NOESY спектрах ЯМР между сигналами протонов исследуемого соединения, относящихся к различным аминокислотным остаткам. С целью определения пространственного строения пептида $A\beta_{1-40}$ в растворе, были проведены расчеты по методу молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH. В качестве исходных экспериментальных данных использовали межпротонные расстояния, полученные из анализа интенсивностей кросс-пиков ЯМР NOESY спектров. Было рассчитано 1000 структур и выбрано 10 с минимальной энергией (Рис.10А). Анализируя полученные данные можно установить, что существует упорядоченная структура со стороны аминного конца, также присутствует вторичная структура на участке с 13 по 23 аминокислотный остаток. Полученные результаты также согласуются с другими исследованиями $A\beta$ пептидов.

Согласно работе [4] $A\beta_{1-40}$ образует комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 17-20 и 29-35). В указанной работе использовался подход, основанный на использовании парамагнитных агентов в экспериментах ЯМР. В растворе ДСН в структуре $A\beta_{1-40}$ наблюдались две альфа-спирали состоящие из аминокислотных остатков 15–24 и 29–35, окруженных подвижными неупорядоченными участками. В качестве результата данных исследований авторы построили схематическое изображение комплекса «пептид– мицелла ДСН» В рамках нашей работы с помощью спектроскопии 2D 1H - 1H NOESY исследован комплекс « $A\beta_{1-40}$ – мицелла ДСН» и определена структура данного комплекса. По аналогичной методике, как это было показано для $A\beta_{13-23}$, $A\beta_{16-22}$ и $A\beta_{10-35}$, $A\beta_{1-40}$ был растворен в растворе с мицеллами ДСН. На основе экспериментально определенных межпротонных расстояний из 2D 1H - 1H NOESY спектров (Рис.11) была рассчитана структура пептида $A\beta_{1-40}$ в растворе с мицеллами ДСН (Рис.10Б).

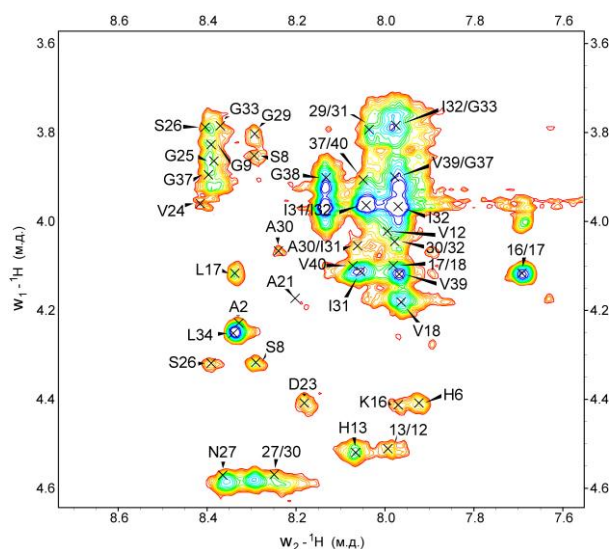


Рисунок 11. Область ^1H - ^1H NOESY спектра ЯМР $\text{A}\beta_{1-40}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с мицеллами ДСН, 293 К.

На основе полученных экспериментальных данных, было установлено наличие структурных различий для пептида в буферном растворе и для пептида находящимся в комплексе с модельной мембраной, а так же наблюдались изменения химических сдвигов у протонов различных аминокислотных остатков. Это обусловлено тем, что вследствие взаимодействия аминокислотных остатков пептида с электроотрицательно заряженной поверхностью мицеллы произошло изменение конформации пептида. На основе этих данных была построена модель исследуемого комплекса (Рис.10В). Как и предполагалось в работе [4], $\text{A}\beta_{1-40}$ образует комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 17-20 и 29-35). Сравнивая полученную структуру $\text{A}\beta_{1-40}$ в растворе с мицеллами ДСН со структурами $\text{A}\beta_{16-22}$, $\text{A}\beta_{13-23}$, $\text{A}\beta_{10-35}$ в этом же растворе, наблюдается хорошее соответствие полученных структур. Таким образом, для $\text{A}\beta$ пептидов было установлено, что в процессе комплексообразования пептида с мицеллой важную роль играют аминокислотные остатки 17-20 и 29-35.

Структура пептида arc- $\text{A}\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН. E22G точечная «арктическая» мутация» пептида $\text{A}\beta_{1-40}$ (arc- $\text{A}\beta_{1-40}$) и $\text{A}\beta_{1-42}$ (arc- $\text{A}\beta_{1-42}$) является редкой мутацией обнаруженной у нескольких семей в северной Швеции. Данная мутация приводит к развитию болезни Альцгеймера в более раннем возрасте (52-57 лет). Арктическая мутация ПБА, на сегодняшний день, является единственной известной мутацией внутри β -амилоида, которая обладает более типично выраженной клинической картиной болезни Альцгеймера.

Пептид arc- $\text{A}\beta_{1-40}$ (E22G) обладает большими скоростями агрегации в растворе, что накладывает ограничения на время экспериментов ЯМР, поэтому в рамках нашей работы был исследован arc- $\text{A}\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе с мицеллами ДСН, т.к. в данном растворе агрегация не наблюдалась в течение трех дней.

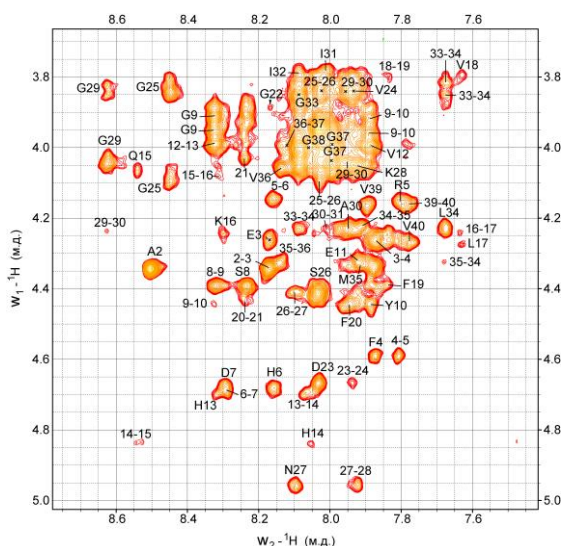


Рисунок 12. Область ^1H - ^1H NOESY спектра ЯМР (500 МГц) arc-A β_{1-40} (E22G) в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. Время смешивания $t_m=0.5$ с.

Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовался подход, основанный на совместном использовании 2D ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY методик. В отличие от ^1H - ^1H NOESY спектров ЯМР для A β_{1-40} в растворе с мицеллами ДСН для «арктической» мутации данного пептида наблюдалось существенное увеличение количества ЯЭО контактов (Рис.12, 13). Это является свидетельством того, что структура данного пептида является более упорядоченной.

Также, для arc-A β_{1-40} (E22G) в 100% растворе D_2O наблюдались сигналы некоторых амидных протонов аминокислотных остатков, что указывает на замедленный обмен протонов на дейтерий для данных групп (Рис.13). На основе полученных данных можно предположить, что указанные амидные протоны участвуют в образовании водородных связей и образуют вторичную структуру пептида.

Таблица 5. Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете структуры.

Использованные ограничения	arc-A β_{1-40} (E22G)
	ДСН
Всего ЯЭО контактов	373
Внутриостаточные	224
Последовательные ($ i-j =1$)	107
Среднего диапазона ($1< i-j <4$)	38
Дальнего диапазона ($ i-j >4$)	4
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами по атомам основной цепи (Å) / 10 структур	
регион 9-35	1.15 ± 0.40

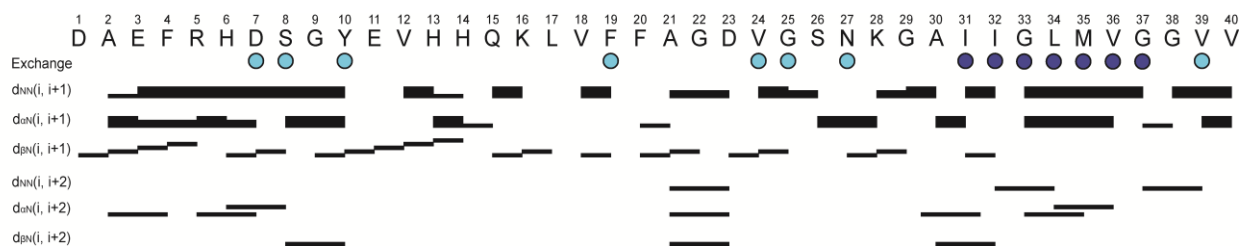


Рисунок 13. Межпротонные контакты ЯЭО для arc-A β_{1-40} (E22G) в растворе с мицеллами ДСН. Часть ЯЭО контактов не приведена вследствие перекрывания и уширения сигналов; светлыми кружками отмечены амидные протоны с замедленным обменом протонов на дейтерий в 100% растворе D₂O (менее 2 часов), темными кружками отмечены амидные протоны, для которых обмен протонов на дейтерий происходил более 24 часов.

Экспериментально полученные межпротонные расстояния использовались как входные данные для расчетов в программе XPLOR-NIH. Было рассчитано 1000 структур и выбрано 10 с минимальной энергией (Рис.14А). В отличие от пептида A β_{1-40} в растворе ДСН, в структуре arc-A β_{1-40} (E22G) присутствовал только один 3_{10} -спиральный регион (аминокислотные остатки 30-35). К тому же на данном участке присутствовала гидрофобная область, и аналогично предыдущим рассуждениям для A β пептидов, была построена модель комплекса пептида arc-A β_{1-40} (E22G) с мицеллой ДСН (Рис.14Б).

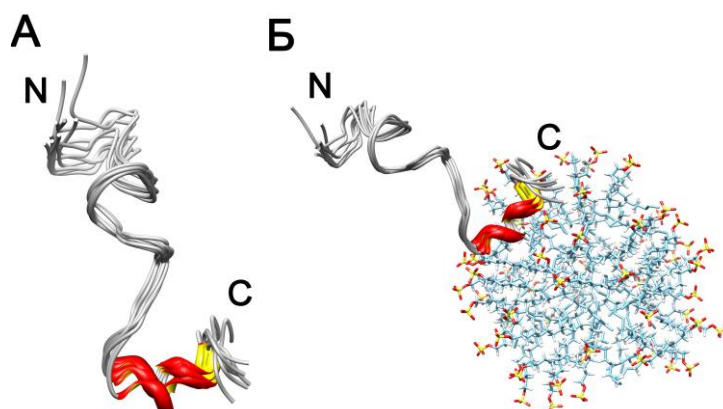


Рисунок 14. А) Структура пептида arc-A β_{1-40} (E22G) в водном растворе (90% H₂O + 10% D₂O) с мицеллами ДСН. Б) Строение комплекса «пептид arc-A β_{1-40} (E22G) – мицелла на основе ДСН».

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На основе экспериментальных данных двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов ЯМР и теоретического моделирования молекулярной структуры (с использованием программы XPLOR-NIH) определены конформации и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) пептидов A β_{1-40} , arc-A β_{1-40} (E22G), A β_{10-35} , A β_{13-23} , A β_{16-22} с нативным содержанием изотопов и их комплексов с модельными биологическими мембранами в растворе.

2. Установлено наличие вторичной структуры в виде 3_{10} -спирали в растворе с мицеллами ДСН для пептидов $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$, $A\beta_{10-35}$ и $\text{arc-}A\beta_{1-40}$ (E22G).
3. Определено положение $A\beta$ пептидов на поверхности мицеллы ДСН, предложена модель комплекса «пептид-поверхность мицеллы». Установлено, что процесс комплексообразования пептида с мицеллой происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19, F20 и G29-M35.
4. Впервые установлена пространственная структура пептида $\text{arc-}A\beta_{1-40}$ (E22G) в растворе ДСН. Установлено, что точечная мутация в аминокислотной последовательности в позиции E22 ведет к изменению во вторичной структуре пептида в области с 13 по 23 аминокислотного остатка, и к тому, что данная область перестает участвовать в процессе комплексообразования пептида с мицеллой ДСН.
5. Полученные данные о пространственном строении $A\beta$ пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула бета-амилоида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки. Взаимодействие $A\beta$ пептидов с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} спиралей, может являться подтверждением механизма образования пор, нарушающих работу мембран нейронов.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balbach J. J. Amyloid fibril formation by A beta(16-22), a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR / J. J. Balbach, Y. Ishii, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, F. Dyda, J. Reed, R. Tycko // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39, № 45. – P. 13748-13759.
2. Rodziewicz-Motowidlo S. The Arctic mutation alters helix length and type in the 11-28 beta-amyloid peptide monomer-CD, NMR and MD studies in an SDS micelle / S. Rodziewicz-Motowidlo, P. Czaplewska, E. Sikorska, M. Spodzieja, A. S. Kolodziejczyk // *Journal of Structural Biology*. – 2008. – V. 164, № 2. – P. 199-209.
3. Rauk A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? / A. Rauk // *Dalton Transactions*. – 2008. – V. 10. – P. 1273-1282.
4. Jarvet J. Positioning of the Alzheimer A beta(1-40) peptide in SDS micelles using NMR and paramagnetic probes / J. Jarvet, J. Danielsson, P. Damberg, M. Oleszczuk, A. Graeslund // *Journal of Biomolecular Nmr*. – 2007. – V. 39, № 1. – P. 63-72.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Усачев, К.С.** Пространственное строение гептапептида $A\beta_{16-22}$ в растворе и комплексе гептапептид – модель биологической мембраны. / К.С. Усачев, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, О.Н. Анцуткин, С. Афонин, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. – 2011. – Т. 153, кн. 3. – С. 91-106.
2. **Usachev, K.S.** Spatial structure of heptapeptide $A\beta_{16-22}$ (beta-amyloid $A\beta_{1-40}$ active fragment) in solution and in complex with a biological membrane model / K.S. Usachev, S.V. Efimov, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, S. Afonin, V.V. Klochkov // Magnetic Resonance in Chemistry – 2012. – V. 50, № 12. – P. 779-834.
3. **Usachev, K.S.** Spatial structure of beta-amyloid $A\beta_{1-40}$ in complex with a biological membrane model / K.S. Usachev, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, V.V. Klochkov // Advances in Alzheimer's Disease – 2012. – V. 1, № 3. – P. 22-29.
4. **Usachev, K.S.** Solution structures of Alzheimer's amyloid $A\beta_{13-23}$ peptide: NMR studies in solution and in SDS / K.S. Usachev, A.V. Filippov, E.A. Filippova, O.N. Antzutkin, V.V. Klochkov // Journal of Molecular Structure. – 2013. – №. 1049. – P. 436-440.
5. **Usachev, K.S.** Use of a combination of the RDC method and NOESY NMR spectroscopy to determine the structure of Alzheimer's amyloid $A\beta_{10-35}$ peptide in solution and in SDS micelles/ K.S. Usachev, A.V. Filippov, O.N. Antzutkin, V.V. Klochkov // European Biophysics Journal – 2013. – V. 42. – P. 1-8. – doi: 10.1007/s00249-013-0928-7.
6. **Усачев, К.С.** Определение структуры бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ (активного фрагмента бета-амилоида $A\beta_{1-40}$) в растворе методами ЯМР спектроскопии и анализ констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия / К.С. Усачев, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», Казань, 2011, 141 с.
7. Блохин, Д.С. Пространственное строение некоторых олигопептидов в растворе и комплексе: олигопептид – модель биологической мембраны / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, И.З. Рахматуллин, **К.С. Усачев**, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», Казань, 2011, 141 с.
8. Блохин, Д.С. Пространственное строение некоторых олигопептидов в растворе и комплексе: олигопептид – модель биологической мембраны / Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, И.З. Рахматуллин, **К.С. Усачев**, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Сборник тезисов III Региональной научно-практической конференции с международным участием «Синтез и перспективы использования новых биологически активных соединений», Казань, 2011, 32 с.

